



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

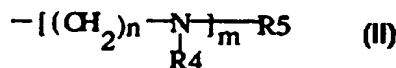
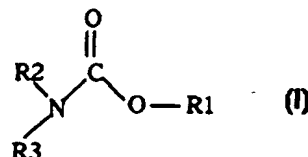
(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C07J 41/00, A61K 31/575, 9/127, C12N 15/88</b>		<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 97/31935</b>
			(43) Date de publication internationale: 4 septembre 1997 (04.09.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00364 (22) Date de dépôt international: 28 février 1997 (28.02.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/02604                      1er mars 1996 (01.03.96)                      FR 96/09557                      30 juillet 1996 (30.07.96)                      FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LEHN, Jean-Marie [FR/FR]; 6, rue des Pontonniers, F-67000 Strasbourg (FR). LEHN, Pierre [FR/FR]; 80, rue Petit, F-75019 Paris (FR). VIGNERON, Jean-Pierre [FR/FR]; 9, rue des Closeaux, F-91790 Boissy-sur-Saint-Yon (FR). (74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).		(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Publiée Avec rapport de recherche internationale.	

(54) Title: COMPOUNDS RELATED TO THE AMIDINIUM FAMILY, PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAME, AND USES THEREOF

(54) Titre: COMPOSES APPARENTES A LA FAMILLE DES AMIDINIUMS, COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT ET LEURS APPLICATIONS

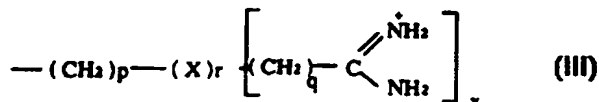
## (57) Abstract

Novel amidinium derivatives of formula (I), wherein R1 is a cholesterol derivative or an alkylamino-NR'R'' grouping, and each of R2 and R3 is independently a hydrogen atom or a grouping of formula (II), wherein each of R4 and R5 is independently a hydrogen atom or a grouping of formula (III), are disclosed. The corresponding pharmaceutical compositions, which are particularly useful in gene therapy for transferring therapeutic genes into cells, are also disclosed.



## (57) Abrégé

La présente invention se rapporte à de nouveaux dérivés d'amidinium de formule (I) dans laquelle: R1 représente un dérivé du cholestérol ou un groupement alkyle amino-NR'R'', R2 et R3 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement de formule (II) dans laquelle R4 et R5 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement de formule (III). La présente invention concerne en outre des compositions pharmaceutiques correspondantes utiles notamment en thérapie génique pour le transfert de gènes thérapeutiques dans des cellules.



# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

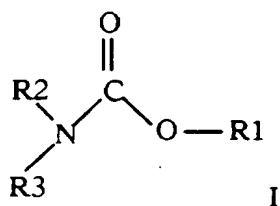
Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

# COMPOSES APPARENTES A LA FAMILLE DES AMIDINIUMS, COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT ET LEURS APPLICATIONS

La présente invention concerne de nouveaux composés apparentés à la famille  
5 des amidiniums dont en particulier les guanidiniums, des compositions  
pharmaceutiques les contenant et leurs applications.

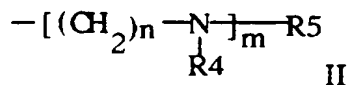
Plus précisément, la présente invention se rapporte à des composés de formule  
générale I et leurs sels



10 dans laquelle:

- R<sup>1</sup> représente un dérivé du cholestérol ou un groupement alkyle amino -  
NR'R'' avec R' et R'' représentant indépendamment l'un de l'autre un radical  
aliphatique, saturé ou non, linéaire ou ramifié en C<sub>12</sub> à C<sub>22</sub>,

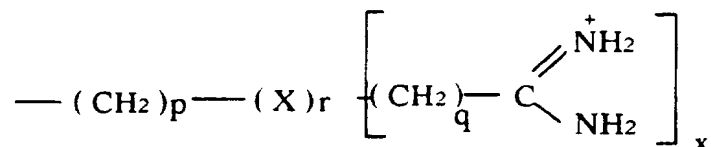
R<sup>2</sup> et R<sup>3</sup> représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou  
15 un groupement de formule générale II avec au moins l'un d'entre eux différent d'un  
atome d'hydrogène,



dans laquelle:

- n et m représentent indépendamment l'un de l'autre et de manière distincte  
20 entre les groupements R<sup>2</sup> et R<sup>3</sup> un entier compris entre 0 et 4,

- R4 et R5 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement de formule III



III

5 dans laquelle

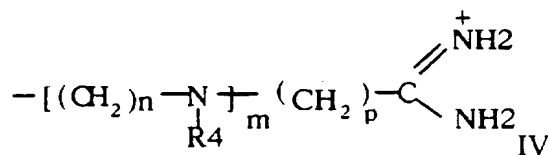
p et q représentent, indépendamment l'un de l'autre, un entier compris entre 0 et 4 et r est égal à 0 ou 1, avec pour r égal à 1

X représentant un groupement NH et x étant alors égal à 1 ou

X représentant un atome d'azote et x étant alors égal à 2 et

10 avec p, q et r pouvant varier indépendamment entre les groupements R4 et R5.

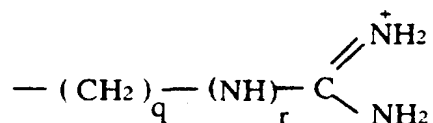
A titre de sous-famille préférée, on citera plus particulièrement dans le cadre de la présente invention les composés de formule générale I dans laquelle R2 ou R3 représentent, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupement de formule IV



15

dans laquelle

n, m et p sont définis comme précédemment et R4 représente un atome d'hydrogène ou un groupement de formule V



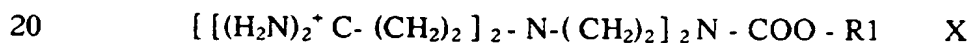
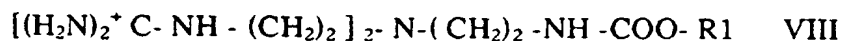
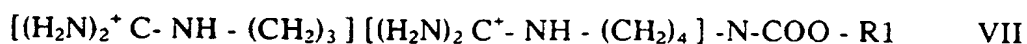
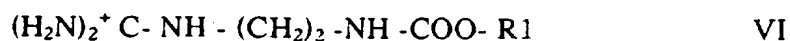
V

avec q et r définis comme précédemment,

et avec m, n, p, q et r pouvant varier de manière indépendante entre les  
5 différents groupements R2 et R3.

Ces nouveaux produits de formule générale (I) peuvent se présenter sous  
forme de sels non toxiques et pharmaceutiquement acceptables. Ces sels non toxiques  
comprennent les sels avec les acides minéraux (acides chlorhydrique, sulfurique,  
bromhydrique, phosphorique, nitrique) ou avec les acides organiques (acides  
10 acétique, propionique, succinique, maléique, hydroxymaléique, benzoïque,  
fumarique, méthanesulfonique ou oxalique) ou avec les bases minérales (soude,  
potasse, lithine, chaux) ou organiques (amines tertiaires comme la triéthylamine, la  
pipéridine, la benzylamine).

A titre représentatif des composés selon l'invention on peut plus  
15 particulièrement citer les composés de sous-formules générales suivantes:



dans lesquelles R1 possède la définition précédente.

A titre représentatif des guanidiniums et amidiniums revendiqués, on peut plus particulièrement citer les composés des sous formules précédentes VII, VIII et IX avec R1 y représentant un groupement cholestéryle. Les trois composés seront respectivement identifiés ci-après sous la désignation BGSC ( Bis Guanidino Spermidine Cholesterol ) et BGTC ( Bis Guanidino Tren Cholesterol ) et BADC (bis chlorhydrate de Bis Amidinium Diéthylènetriamine Cholesterol ).

Les composés revendiqués sont tout particulièrement intéressants sur le plan thérapeutique pour leurs caractères non toxiques et leur propriétés amphiphiles. Compte -tenu de ces qualités, il peuvent notamment être utilisés pour la complexation d'acides nucléiques dans la perspective d'une transfection cellulaire de ceux-ci. Ces composés peuvent donc être avantageusement employés en thérapie génique.

Les composés VII (BGSC) et VIII (BGTC) sont tout particulièrement avantageux pour le transfert de gène in vivo. Ces deux composés se complexent avec l'ADN et le protègent contre la dégradation due aux variations de pH lors du transport vers la cellule à traiter.

L'invention concerne donc une composition pharmaceutique qui comprend au moins un composé selon l'invention. Dans un mode de réalisation préféré de l'invention le composé est le Bis Guanidino Spermidine Cholesterol (BGSC) et dans un autre mode préféré le composé est le Bis Guanidino Tren Cholesterol (BGTC).

La thérapie génique a pour principal objectif de corriger des maladies génétiques associées à un défaut d'expression et/ou une expression anormale, c'est à dire déficiente ou excessive, d'un ou plusieurs acides nucléiques. On tente de suppléer à ce type d'anomalies génétiques par le biais de l'expression cellulaire in vivo ou in vitro de gènes clonés.

Aujourd'hui, plusieurs méthodes sont proposées pour la délivrance intracellulaire de ce type d'information génétique. L'une des technologies actuellement mises en oeuvre, repose précisément sur l'emploi de vecteurs chimiques ou biochimiques. Ces vecteurs synthétiques ont deux fonctions principales, compacter

l'ADN à transférer et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à travers la membrane plasmique et, le cas échéant, à travers les deux membranes nucléaires. Des lipides cationiques chargés positivement comme le chlorure de N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium (DOTMA) ont ainsi été proposés.

5   Avantageusement, ils interagissent, sous la forme de liposomes ou de petites vésicules, spontanément avec de l'ADN, qui est lui chargé négativement, pour former des complexes lipides-ADN, capables de fusionner avec les membranes cellulaires, et permettent ainsi la délivrance intracellulaire de l'ADN. Toutefois, dans le cas particulier du DOTMA, sa bonne efficacité au niveau de la transfection demeure

10   malheureusement associée à un défaut de biodégradabilité et un caractère toxique à l'égard des cellules.

Depuis le DOTMA, d'autres lipides cationiques ont été développés sur ce modèle de structure : groupe lipophile associé à un groupement amino via un bras dit "spacer". Parmi ceux-ci, on peut plus particulièrement citer ceux comprenant à titre de

15   groupement lipophile deux acides gras ou un dérivé du cholestérol, et comportant, en outre, le cas échéant, à titre de groupement amino, un groupement d'ammonium quaternaire. Les DOTAP, DOBT ou le ChOTB peuvent notamment être cités à titre représentatifs de cette catégorie de lipides cationiques.

De part leur structure chimique et leur caractère biodégradable, les composés

20   revendiqués répondent précisément aux exigences requises pour un vecteur de transfection d'acides nucléiques.

La présente invention vise donc également toute application de ces nouveaux composés dans la transfection in vitro, ex vivo et/ou in vivo de cellules et notamment pour la vectorisation d'acides nucléiques. Elle se rapporte en particulier à toute

25   composition pharmaceutique comprenant, outre au moins un composé selon l'invention, un acide nucléique.

Dans les compositions de la présente invention, l'acide nucléique associé à au moins un composé revendiqué peut être aussi bien un acide désoxyribonucléique qu'un

acide ribonucléique. Il peut s'agir de séquences oligonucléotidiques ou polynucléotidiques d'origine naturelle ou artificielle, et notamment d'ADN génomique, d'ADNc, d'ARNm, d'ARNt, d'ARNr, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces acides nucléiques peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc. Ils comportent de préférence un gène thérapeutique.

Un autre objet de l'invention porte donc sur une composition pharmaceutique contenant en outre un acide nucléique. Préférentiellement cet acide nucléique est soit un acide désoxyribonucléique soit un acide ribonucléique. Dans un mode préféré de réalisation de l'invention l'acide nucléique comporte un gène thérapeutique.

Au sens de l'invention, on entend par gène thérapeutique notamment tout gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit protéique ainsi codé peut être une protéine, un peptide, etc. Ce produit protéique peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.



Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les

5 facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc la dystrophine ou une minidystrophine (FR 9111947), la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, les gènes intervenant dans la

10 réparation de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase), les gènes de l'hémoglobine ou d'autres transporteurs protéiques, les gènes correspondant aux protéines impliquées dans le métabolisme des lipides, de type apolipoprotéine choisie parmi les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J et apo(a), les enzymes du métabolisme comme par exemple la lipoprotéine lipase, la

15 lipase hépatique, la lécithine cholestérol acyltransférase, la 7 alpha cholestérol hydroxylase, la phosphatidique acide phosphatase, ou encore des protéines de transfert de lipides comme la protéine de transfert des esters de cholesterol et la protéine de transfert des phospholipides, une protéine de liaisons des HDL ou encore un récepteur choisi par exemple parmi les récepteurs LDL, récepteurs des

20 chylomicrons-remnants et les récepteurs scavenger.etc.

L'acide nucléique thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par

exemple, être transcrites dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Les gènes thérapeutiques comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN  
5 cibles (EP 321 201).

Comme indiqué plus haut, l'acide nucléique peut également comporter un ou plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet donc la réalisation soit de vaccins soit de traitements  
10 immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des microorganismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, du "syncytia forming virus, d'autres virus ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

15 Préférentiellement, l'acide nucléique comprend également des séquences permettant l'expression du gène thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide antigénique dans la cellule ou l'organe désiré. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de  
20 séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du

génomique de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de  
5 régulation, etc. Il peut aussi s'agir de promoteur, inductible ou répressible.

Par ailleurs, l'acide nucléique peut également comporter, en particulier en amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir  
10 de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle. L'acide nucléique peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé vers un compartiment particulier de la cellule.

Les lipides cationiques décrits dans la présente invention, et, en particulier, le BGTC et le BGSC, sont capables de se complexer avec l'ADN, et représentent une  
15 alternative avantageuse aux vecteurs viraux pour le transfert d'acides nucléiques d'intérêt thérapeutique, in vitro, ex vivo ou in vivo. Du fait des propriétés chimiques des groupes guanidinium, et en particulier de leur pKa élevé, ces lipides cationiques sont capables de protéger les molécules d'ADN contre les dégradations dues aux variations de pH. Les résultats présentés dans les exemples montrent que ces  
20 composés permettent la transfection de nombreux types cellulaires, avec une grande efficacité. L'efficacité de la transfection dépend en particulier du rapport lipide cationique / ADN dans les complexes formés. Un rapport entre les deux composés particulièrement favorable pour la transfection consiste à avoir 6 à 8 groupes guanidinium pour un groupe phosphate sur l'ADN.

L'efficacité de transfection des complexes lipide cationique /DNA peut en outre être améliorée par addition de lipide neutre, et formation de liposomes cationiques. Ces liposomes sont formés par un complexe entre le lipide cationique et le lipide neutre. Celui-ci peut être choisi parmi :

- 5           - la dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE),
- l'oléoyl-palmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE),
- le di-stéaroyl, -palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamine
- leurs dérivés N-méthylés 1 à 3 fois;
- les phosphatidylglycérols,
- 10          - les diacylglycérols,
- les glycosyldiacylglycérols,
- les cérebrosides (tels que notamment les galactocérebrosides),
- les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines)
- et les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).
- 15          On utilise préférentiellement la DOPE.

Préférentiellement, le composé de l'invention et le lipide neutre sont présents dans un rapport compris entre 1 et 5, plus préférentiellement 2 et 4. En outre le rapport lipide total (composé de l'invention plus lipide neutre) sur DNA est avantageusement choisi de sorte que le rapport net de charges positives soit compris

20       entre 2 et 5. Particulièrement avantageusement, le rapport est de 3 environ.

L'invention concerne donc également toute composition pharmaceutique comprenant un composé selon l'invention, un lipide neutre et un acide nucléique. Préférentiellement le composé selon l'invention est choisi parmi le BGTC et le BGSC.

Tout aussi préférentiellement le lipide neutre est la DOPE. L'acide nucléique est soit un acide désoxyribonucléique soit un acide ribonucléique. Préférentiellement l'acide nucléique comporte un gène thérapeutique.

5        Outre cette application des dérivés d'amidinium revendiqués, il est également possible d'envisager leur valorisation dans les applications suivantes: interférence au niveau d'interactions entre acides nucléiques et protéines résultant dans une inhibition ou stimulation de certains processus par exemple de régulation d'expression génétique ou d'activité enzymatique ( polymérase, transcriptase, etc....), complexation sélective  
10        d'espèces anioniques pour leur extraction, leur élimination ou leur détection à l'aide de sondes/électrodes à membrane par exemple, utilisation comme réactif de laboratoire pour effectuer des opérations de transfection in vitro, etc.

En conséquence, la présente invention a également pour objet toute application thérapeutique des dérivés d'amidinium tels que décrits précédemment, soit directement, soit au sein de compositions pharmaceutiques.

15        De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent également un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau de l'organe désiré, ou pour une administration par voie topique (sur peau et/ou muqueuse). Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment  
20        lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples et figures qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

## FIGURES

25        Figure 1 : Représentation schématique des protocoles opératoires de préparation du BGSC et BGTC.

Figure 2 : Représentation schématique des protocoles opératoires de préparation du BADC.

Figure 3 : Mesure de l'efficacité de transfection en fonction du rapport composé lipidique/ADN.

5        Figure 4 : Mesure de l'efficacité de transfection en fonction du rapport lipides totaux / ADN.

Figure 5 : Mesure de l'effet sérum sur l'efficacité de transfection de cellules HepG2 (5A), HeLa (5B), NIH 3T3 (5C) et 293 (5D). Barres grises : Présence de sérum; Barres vides : transfections en absence de sérum pendant 2h.

10        Figure 6 : Photographies de cryosections de trachées murines montrant l'expression de gène reporter dans l'épithélium de l'appareil respiratoire après transfection in vivo avec des liposomes BGTC/DOPE. (6A) et (6B) : Détection de l'expression de la beta-galactosidase dans des cellules transfectées, localisées à la surface de l'épithélium (6A) et dans les glandes sous mucosales (6B); (6C) : Détection  
15        des cellules exprimant la beta-galactosidase dans les glandes sous-mucosales par marquage à l'immunoperoxidase en utilisant un anticorps monoclonal anti-beta-galactosidase; (6D) : détection des cellules exprimant la luciférase dans les glandes sous-mucosales par marquage à l'immunoperoxidase en utilisant un anticorps polyclonal anti-luciférase; (6E) : coloration à l'immunoperoxidase: contrôle négatif effectué en  
20        absence d'anticorps.

Figure 7 : Mesure de l'efficacité de transfert de gènes in vivo par injection intraveineuse d'un complexe ADN/BGTC-liposome.

Figure 8 : Mesure de l'efficacité de transfert de gènes in vivo par injection intrapéritonéale d'un complexe ADN/BGTC-liposome.

## 25        A- PREPARATION DE DERIVES SELON L'INVENTION

### MATERIEL ET METHODES

### 1. Mesures physiques

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton ( RMN  $^1\text{H}$  ) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AC200. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au TMS.

### 5      2. Chromatographies sur silice

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques de gel de silice Merck de 0,2 mm d'épaisseur

Les chromatographies sur colonne ont été effectuées sur gel de silice 60 Merck de granulométrie 0,040-0,063mm.

### 10      EXEMPLE 1:

#### PREPARATION DU GUANIDINO SPERMIDINE CHOLESTEROL BGSC

##### **-1; Préparation du Di-Boc carbamate (1)**

On ajoute une solution de chloroformate de cholesteryl(0,9g, 2mmol) et de  
15       $\text{Et}_3\text{N}$  (0,214g, 2mmol) dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40ml) à une solution de  $^1\text{N},^8\text{N}$ -Boc<sub>2</sub>-spermidine (0,690g, 2mmol) dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20ml). Après reflux pendant 5 heures, le mélange est lavé à l'eau (2x50ml), séché sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et le solvant est évaporé. Le produit brut est purifié par chromatographie sur un gel de silice utilisant  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  95/5 comme éluant pour donner du pur carbamate (1,3g, 86%).

20       $^1\text{H}$  NMR,  $\delta(\text{CDCl}_3, 200 \text{ Mhz})$  ; 0,5-2,5(m, structure de cholesteryl, Boc signal et groupes centraux  $\text{CH}_2$  depuis le spermidine), 3,1-3,3(m, 8H,  $\text{N-CH}_2$ ), 4,50(m,1H, $\text{H}_{3a}$ ), 5,37(d,1H, $\text{H}_\delta$ ).

##### **- 2. Préparation de l'aminocarbamate(2)**

On dissout le composé (1) (1,3g) dans 20ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et l'on ajoute à cette solution refroidie (lit de glace) 2ml de  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  fraîchement distillé pour libérer les groupes protecteurs BOC. Après agitation à température ambiante pendant 3 heures, on ajoute 50ml de  $^1\text{N}$  NaOH et le mélange est extrait avec  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Les couches organiques sont lavées à l'eau, séchées sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et évaporées pour obtenir l'aminocarbamate (2) brut (0,945g, 98%).

$^1\text{H}$  NMR.  $\delta(\text{CDCl}_3, 200 \text{ Mhz})$  ; 0,5-2,5(m, structure de cholesteryl et groupes centraux depuis le spermidine), 2,7(m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-N-CO-}$ ), 3,25 (large m, 4H,  $\text{N-CH}_2$ ), 4,49(m, 1H,  $\text{H}_{3\alpha}$ ), 5,35(d, 1H,  $\text{H}_6$ ).

### 3.- Synthèse du BGSC.

On dissout le carbamate (2) brut (0,94g) dans 30ml de THF/MeOH 85/15. Puis on ajoute du 1H-pyrazolecarboxamidine (0,495g, 3,4mmol) et du diisopropylethylamine (0,436, 3,4mmol) dans 30ml de THF/MeOH 85/15. Après agitation à température ambiante pendant 18 heures on ajoute lentement 250 ml de diethylether et on sépare le précipité obtenu par décantation. Le composé brut est mis en suspension trois fois dans du diethylether et séparé par décantation pour donner du GSC pur (0,570g, 47%).

$^1\text{H}$  NMR  $\delta(\text{DMSO } d_6) 200 \text{ MHz}$  ; 0,5-2,5(m, structure du cholesteryl et  $\text{CH}_2$  central), 3,1(m, 8H,  $\text{N-CH}_2$ ), 4,3(m, 1H,  $\text{H}_{3\alpha}$ ), 5,3(d, 1H,  $\text{H}_6$ ) ; 7,2 (large s, 8H,  $\text{NH}_2^+$ ), 7,8(s, 2H, NH), Anal. Calc. pour  $\text{C}_{37}\text{H}_{67}\text{N}_7\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$ , C, 62,15 ; H, 9,67 ; N, 13,71.

Résultat d'analyse élémentaire: C, 62,28 ; H, 9,81 ; N, 13,15.

### EXEMPLE 2:

### PREPARATION DU GUANIDINO TREN CHOLESTEROL, BGTC

#### 1. préparation de l'Aminocarbamate (5)



On ajoute lentement une solution de chloroformate de cholesteryl (1,8g, 4mmol) dans 100 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  à une saturation de tris(2-aminoéthyl)amine(TREN) (11,68 g, 80 mmol) dans 400 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Après agitation à température ambiante pendant deux heures, on libère l'amine inerte par lavage à l'eau (3x100ml) et après  
 5 séchage sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  on évapore le solvant. On isole (5) sous forme de trihydrochloride de la manière suivante : on dissout le produit brut dans 10ml de MeOH et l'on ajoute goutte à goutte une solution saturée de HCl methanolique (5ml) ; le précipité obtenu est séparé par décantation et, pour obtenir un composé pur, est mis en suspension trois fois dans MeOH et séparé par décantation. Après séchage sous vide le trihydrochloride  
 10 (6) pur est obtenu (1,71g, 64%).

$^1\text{H}$  NMR  $\delta(\text{CDCl}_3 + \text{eCD}_3\text{OD}, 200\text{MHz})$  : 0,5-2,4(m, structure de cholesteryl), 2,5(m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ), 2,8(large s, 4H, +HN- $\text{CH}_2$ ), 3,06(large s, 4H,  $\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ ), 3,20(m, 2H, \*HN- $\text{CH}_2$ ), 4,4(m, 1H,  $\text{H}_{3a}$ ), 5,3(d, 1H,  $\text{H}_6$ ), Anal. Calc. pour  $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot 3\text{HCl}$  ; C, 61,10 ; H, 9,80 ; N, 8,38. Résultat : C, 61,25 ; H, 9,96 ; N, 8,22.

## 15 2- Préparation du B.GTC

On ajoute lentement une solution de chloroformate de cholesteryl (2,24g, 5mmol) dans 100ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  à une large saturation de tris(2-aminoéthyl)amine(TREN) (29,2g, 200mmol) dans 250ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Après agitation à température ambiante pendant 2 heures, on libère l'amine inerte par lavage à l'eau  
 20 (3x100ml) et après séchage sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , le solvant est évaporé. Le produit brut (3,2g) est dissous dans THF/MeOH 50/50 (20ml) ; puis l'on ajoute au mélange du 1H-pyrazole-1-carboximidine (1,465g, 10mmol) et du diisopropylamine (1,3g, 10mmol). Après agitation à température ambiante pendant 18 heures, on ajoute du diethylether et le précipité obtenu est séparé par décantation. Afin d'obtenir un échantillon pur, le  
 25 composé brut est mis en suspension trois fois dans du diethylether et séparé par décantation (2,15g), 60% après séchage sous vide.

$^1\text{H}$  NMR(DMSO-d<sub>6</sub>, 200MHz) ; 0,5-2(m, structure du cholesteryl), 2,2(m, 2H, N- $\text{CH}_2$ ), 2,6(large s, 4H, N- $\text{CH}_2$ ), 3,0(d, 2H, N- $\text{CH}_2$ ), 3,2(large s, 4H),

4,3(m,1H,H<sub>3a</sub>), 5,3(d,1H,H<sub>6</sub>), 7,3(large s,8H,NH<sub>2</sub>+), (7,8(large s,2H,NH). Anal. Calc. pour C<sub>36</sub>H<sub>66</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>.2HCl ; C,60,39 ; H,9,57 ; N,15,65. Résultat : C,60,38 ; H,9,67 ; N,15,56.

### EXEMPLE 3:

## 5 PREPARATION DU BIS-CHLORHYDRATE DE BIS AMIDINIUM BACD.

### 1.Préparation du dinitrile

On ajoute une solution de chloroformate de cholestéryle (8,97g; 20mmol.) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100ml) goutte à goutte à une solution d'iminopropionitrile (2,46g, 20mmol.) et Et<sub>3</sub>N ( 2.02 g, 20 mmol dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100ml). Après agitation à la température ambiante, pendant 6 heures, on lave à l'eau (2x 100ml) et sèche sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Le solvant est évaporé et le produit brut (10,5g) est recristallisé dans le méthanol. (8,59g; 80%).

15 <sup>1</sup>H NMR δ(CDCl<sub>3</sub>, 200MHz). 0,5-2,5(m, structure de cholesteryl), 2,7 (m, 4H; -CH<sub>2</sub>CN), 3,62 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-N-), 4,50 (m,1H,H<sub>3a</sub>), 5,39(d,1H,H<sub>6</sub>).

### 2. Préparation du dithioamide

Dans une solution du dinitrile, préparé comme décrit précédemment, ( 0,324g, 6mmol.) et de diéthylamine ( 0,884g; 12mmol) dans du DMF (30ml), maintenue à 50°C, on fait barboter pendant 2 heures un léger courant de H<sub>2</sub>S. On verse la solution bleue sur de la glace et on sépare le précipité ainsi obtenu par filtration. On dissout ce produit brut dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et lave à l'eau (2x50ml). Après séchage sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, le solvant est évaporé et le produit obtenu recristallisé deux fois dans du méthanol (1,86g; 51,5%).

25 <sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>, 200MHz) ; 0,5-2,5(m, structure du cholesteryl), 2,67(t,4H,N-CH<sub>2</sub>), 3,50(t,4H,S=C-CH<sub>2</sub>), 4,3(m,1H,H<sub>3a</sub>),5,33(d,1H,H<sub>6</sub>).

### 3. Préparation du bis-iodure de dithioamidate

A une solution de dithioamide (0,603g; 1mmol) dans de l'acétone (20ml), on ajoute de l'iodure de méthyle (2ml) et on laisse reposer à la température ambiante pendant 48 heures. On filtre le précipité obtenu (0,741g; 83,5%). Ce produit est utilisé  
5 directement sans purification annexe.

### 4. Préparation du bis chlorhydrate de bis amidinium BADC.

Dans une suspension au reflux du bis-iodure (0,741g; 0,83mmol.), tel qu'obtenu précédemment, dans de l'isopropanol (10ml) on fait barbotter un courant de  $\text{NH}_3$  pendant 2 heures puis on continue de chauffer au reflux 4 heures supplémentaires.  
10 On évapore l'isopropanol et le résidu est repris dans du méthanol (10ml). Après passage de cette solution sur une résine échangeuse d'ions basique, on fait passer un courant d'acide chlorhydrique dans l'éluant et on évapore à sec. Le bis chlorhydrate ainsi obtenu, est dissous dans le minimum d'éthanol (environ 5ml). On filtre un léger insoluble et on rajoute au filtrat un large excès d'éther diéthylique. On obtient une  
15 poudre que l'on filtre et l'on sèche (320mg; 60%). Une recristallisation dans l'isopropanol permet d'isoler le produit attendu, sous une forme analytiquement pure.

$^1\text{H}$  NMR(DMSO $d_6$ , 200MHz) ; 0,5-2,6(m, structure du cholesteryl et- $\text{CH}_2$ -amidinium), 3,57 (s, large 4H, N- $\text{CH}_2$ ), 4,3(m, 1H,  $\text{H}_{3a}$ ), 5,3(d, 1H,  $\text{H}_6$ ), 8,64 (s, large; 2H;  $\text{NH}_2$ ), 9,07 (s; large; 1H; NH), 9,18 (s; large; 2H).

20 Anal. Cal. Pour  $\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_2$ , 2HCl: C, 65,25. H, 9,32; N, 8,94. Résultat C, 65,40. H, 9,87; N, 9,55.

## B: UTILISATION DE DERIVES SELON L'INVENTION POUR LE TRANSFERT DE GENES IN VITRO ET IN VIVO

### MATERIELS ET METHODES

25 1- Les essais de transfection qui suivent sont effectués avec du BGSC et du BGTC préparés selon les protocoles décrits dans les exemples 1 et 2.

## 2 - Preparation des liposomes

Un mélange de lipide cationique et de DOPE (dans un rapport molaire de 3/2) dans du chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ) est évaporé sous vide et remis en suspension dans une solution de tampon HEPES 20 mM à PH 7,4, sous une atmosphère  $\text{N}_2$ .

5 La concentration finale en lipide est de 1,2 mg/ml.

Le mélange est vortexé pendant 5 mn, puis « soniqué » pendant 5 mn avec un sonificateur (Branson Ultrasonic 2210), enfin stocké à + 4°C pendant 24 h pour hydratation.

10 La dispersion résultante est « soniquée » de nouveau (Sonifier Branson 450) pendant 5 à 10 mn pour former des liposomes.

Après centrifugation, la solution est filtrée sur un filtre de diamètre de pore  $0.22\mu$  (Millex GS, Millepore) et stockée à + 4°C.

15 La taille des liposomes contenant BGSC ou BGTC a été étudiée à l'aide d'un appareil à diffraction laser (Autosizer 4700, Malvern Instruments). Cette étude montre un pic unique correspondant à un diamètre moyen de 50nm en analyse multimodale par nombres.

## 3 - Cultures cellulaires

L'origine (espèce et tissus) de la plupart des lignées cellulaires utilisées pour les expériences de transfection est donnée dans le tableau I.

20 Les cellules de la lignée cellulaire HeLa (P Briand, ICGM Paris) sont dérivées d'un carcinome humain d'origine épithéliale cervicale.

Les cellules NIH 3T3 (C Lagrou, Institut Pasteur, Lille) sont des fibroblastes de souris.

La lignée cellulaire NB2A (C. Gouget, Paris) est dérivée d'un neuroblastome de souris.

Toutes les cellules à l'exception des cellules AtT-20 et PC12, ont été cultivées dans du milieu Dulbecco modifié (DMEM, GIBCO) complémenté avec 10 % de sérum de veau fetal (FCS; GIBCO), de la pénicilline à 100 unités/ml (GIBCO) et de la streptomycine (GIBCO) à 100µg/ml.

Les cellules AtT-20 ont été cultivées dans du DMEM/F12 (GIBCO) complémenté avec 10 % de sérum de veau fetal.

Les cellules PC12 ont été cultivées dans du DMEM complémenté avec 10 % FCS et 5 % de sérum de cheval.

Toutes les cellules ont été maintenues en culture dans des boîtes plastiques (Falcon) sous atmosphère humide à 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### 4 - Plasmides

Les plasmides pRSV-Luc (O. BENSAUDE, ENS, Paris), et pRSV-nlsLacZ ont été amplifiés dans E. Coli et préparés par purification sur gradient CsCl par des techniques standard. Dans le plasmide pRSV-nlsLacZ, et le plasmide pRSV-Luc, le gène LacZ d'E.coli et sa séquence signal de localisation nucléaire et le gène luciférase sont respectivement sous le contrôle transcriptionnel du LTR/RSV (Rous Sarcoma Virus). Le plasmide pXL2774 comporte le gène codant pour la luciférase sous contrôle du promoteur du cytomégalovirus (CMV).

#### 5 - Protocole de transfection in vitro

Le jour précédent la transfection  $2 \times 10^5$  cellules sont déposées par puits (plaques à 6 puits Falcon).

Chaque puits contient une lignée cellulaire différente.

Ainsi au jour de la transfection les cellules sont à demi confluentes.

L'ADN plasmidique (5µg) et la quantité désirée de lipide bis-guanidinium ont été chacun dilués dans 250µl de DMEM sans FCS et vortexé. Après environ 5 min les deux solutions ont été laissées à incuber à température ambiante pendant 15min. Le mélange de transfection est alors ajouté aux cellules (0,5 ml par puits) qui ont été lavées avec un milieu sans sérum. Après 4 à 6 heures d'incubation à 37°C, 1 ml de milieu avec sérum est ajouté dans chaque puits sans que l'on enlève le mélange de transfection. 24 heures après la transfection, le milieu est remplacé par 1 ml de milieu de culture frais. Les cellules sont recueillies 2 jours après la transfection pour mesurer l'expression de la luciférase.

10 Des transfections témoins ont été faites en utilisant des agents de transfections commercialisés :

- la lipopolyamine Transfectam ® (JP Behr, Strasbourg, France) a été utilisée en solution alcoolique à un rapport optimum de charges ioniques Transfectam ®/DNA 6-8.

15 - la Lipofectin ® (Life Technologies Inc., Cergy Pontoise, France) qui est une formulation de liposomes ayant pour lipide neutre la DOPE et pour lipide cationique le DOTMA.(N[1(2,3-dioleoyloxy) propyl]-N, N, N- trimethylammonium chloride).

Les complexes ADN/Liposomes ont été obtenus dans les conditions standard recommandées par le fabricant.

20 - des cellules ont été transfectées par précipitation au phosphate de calcium. (Keown, W.A., Campbell, C.R. ; Kucherlapati, R.S. (1990) *Methods in Enzymology* ; Academic Press : New York, 185, 527-537).

#### 6 - Mesure de la luciférase pour les transfections réalisées in vitro

L'activité luciférase est mesurée 48 heures après transfection en utilisant une variante la procédure de De Wet et al. (De Wet, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R. & Subramani, S. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 725-737.)

- on retire le milieu de culture
- les cellules sont lavées avec une solution saline de tampon phosphate froid
- puis elles sont lysées par incubation dans 250 µl de tampon de lyse (25mM triphosphate pH7;8, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dithiotreitol, 15 % de glycerol et 1 % de triton X-100).
- on obtient un lysat clair après élimination des matériaux insolubles par centrifugation (15mm a + 4°C) dans une microcentrifugeuse.
- un Aliquot (20µl) d'extrait cellulaire est dilué dans 100µl de tampon de lyse auquel on ajoute 9µl d'ATP 25 mM (sigma) et 20µl de luciferine 25mM (sigma).
- les échantillons sont placés dans un luminomètre (Lurmet LB9501 Berthold, Nashua, NH) et on mesure l'émission lumineuse pendant 10 secondes.

L'étalonnage de la courbe RLU/Luciferase a été fait en utilisant différentes dilutions de luciferase de luciole purifiée (sigma) et montre que la partie linéaire de la courbe va de 10<sup>4</sup> a 10<sup>7</sup> RLU (relative light units).

- La concentration en protéine a été mesurée par le test BCA (acide bicinchoninique) en utilisant la serumalbumine bovine comme témoin.

Les données pour l'activité luciférase sont exprimées en RLU/mg de protéine.

#### 7 - Protocole d'injection in vivo au niveau des voies respiratoires de souris

- Les souris utilisées sont des souris mâles OF1 (poids 30g) issues de Iffa-Credo (Lyon, France). Des liposomes cationiques BGTC/DOPE (rapport molaire 3:2) sont utilisés. Le mélange de transfection est obtenu à partir de 10µg d'ADN plasmidique (dans 10µl eau), 20µl de liposomes cationiques dans un milieu Hepes 20mM (pH 7.4), à une concentration lipidique totale de 5mg/ml. Les agrégats ADN/lipides ainsi formés possèdent un rapport charge de l'ordre de 6.

Après anesthésie des souris avec du pentobarbital, le mélange de transfection (30 $\mu$ l) est injecté dans les voies respiratoires par instillation intratrachéale via une canule insérée dans le lumen trachéal. 48h après l'instillation les animaux sont sacrifiés par overdose de pentobarbital et les poumons et trachées prélevés pour analyse.

5      8- Coloration à l'X-gal

Pour doser l'expression de la beta-galactosidase d'E.coli dans les cultures primaires, on imprègne les cellules pendant 15 minutes à 4°C avec une solution de paraformaldéhyde à 4% et on les incube ensuite avec de l'X-gal de substrat beta-galactosidase chromogénique (Sigma). La coloration bleue des noyaux des cellules transfectées est dosée par microscopie par luminescence.

10      9- Dosage des cellules X-gal au niveau des voies respiratoires transfectées in vivo

Pour la détection des cellules X-gal au niveau des voies respiratoires, les poumons et trachées sont traités 1h dans du paraformaldéhyde à 4%, immergés ensuite toute une nuit dans du PBS contenant 30% de sucrose, puis incorporés dans un milieu de congélation et congelés à l'azote liquide. Des sections de cryostats de 5 $\mu$  sont ensuite colorées pour l'activité de  $\beta$ -galactosidase par incubation toute une nuit avec du réactif X-gal (Sigma).

15      10- Dosage de la luciférase au niveau des voies respiratoires transfectées in vivo

Pour doser l'activité luciférase à l'issue des transfections in vivo, des fragments de tissus sont mis en présence de 30 $\mu$ l de tampon de lyse (25mM Tris-phosphate pH7.8, 1mM dithiothreitol (DTT), 15% glycerol et 1% Triton X-100), lysés en environ 1min avec un homogénéiseur (Polylabo, Strasbourg, France) et conservés sur glace. Après centrifugation, 20 $\mu$ l de lysat est utilisé pour le dosage. L'activité luciférase est exprimée en RLU par mg de protéine.



### 11- Protocole d'immunohistochimie

Des cryosections d'échantillons de poumons et trachées sont incubées 1h avec soit des anticorps murins monoclonaux anti-  $\beta$ -galactosidase d'E coli à 5 $\mu$ g/ml (Genzyme, Cambridge, MA) ou des anticorps de lapin polyclonaux 1:400 dilution (Promega).

La protéine  $\beta$ -galactosidase d'Escherichia coli est dosée par coloration à l'immunoperoxidase en utilisant un anticorps secondaire anti Ig de souris marqué à la biotine (Boehringer) et un conjugué streptavidin-POD (Boehringer). La protéine luciférase est dosée par coloration à l'immunoperoxidase en utilisant un anticorps de chèvre anti-lapin (ICN Biomedicals, Inc) et le système peroxidase-antiperoxidase de lapin (PAP) (Dako Glostrup, Denmark). Les sections sont examinées par microscopie lumineuse. Des contrôles négatifs sont effectués sans anticorps.

### EXEMPLE 4:

### TRANSFECTIONS IN VITRO A DES RAPPORTS AGENT DE TRANSFECTION /ADN DIFFERENTS

Afin d'optimiser l'efficacité de transfection obtenue avec des agrégats BGTC/ADN, la demanderesse a étudié l'influence du rapport BGTC/ADN sur le taux de transfection dans 3 types différents de cellules de mammifères connus pour leur relative sensibilité aux méthodes de transfection classique. Les résultats sont présentés en figure 3.

Des expériences de transfection ont donc été réalisées avec des fibroblastes murins 3T3 des cellules épithéliales humaines HeLa et des neuroblastomes de souris NB2A. Au cours de ces expériences une certaine quantité fixe de plasmide pRSV-Luc a été mise en contact avec des quantités variables de BGTC en solution. Pour déterminer la fourchette de rapport à étudier la demanderesse est partie du principe qu'un  $\mu$ g d'ADN équivaut à 3 nm de phosphate chargé négativement et que seulement deux groupes guanidinium sont chargés positivement au pH neutre de formation des

agrégats et de transfection. On mesure l'activité luciférase 48h après la transfection. L'expression de la luciférase est maximale pour des agrégats contenant de 6 (cellules HeLa) à 8 (cellules 3T3, NB2A) groupes guanidinium pour un groupe phosphate de l'ADN c'est à dire des agrégats ayant une charge positive importante.

## 5 EXEMPLE 5

### TRANSFECTIONS IN VITRO AVEC DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES.

Le transfert de gènes par l'intermédiaire de lipides cationiques est une technique de transfection attractive non seulement du fait qu'elle ne nécessite pas d'intermédiaires mais aussi parce qu'elle permet de transfecter une très grande variété de cellules de tissus et d'organismes différents. Pour étudier l'étendue de l'efficacité du BGTC comme agent de transfection plusieurs lignées cellulaires d'origines diverses ont été testées. Les résultats sont exposés dans le tableau 1 ci-après. Le rapport de charges a été choisi entre 6 et 8 pour une efficacité maximale. Afin d'établir une comparaison, des cellules des mêmes lignées ont également été transfectées en utilisant une lipopolyamine d'une part et d'autre part du phosphate de calcium. Les résultats montrent que le BGTC est normalement aussi efficace que le Transfectam et deux fois plus efficace que le phosphate de calcium.

20 Tableau 1 : Expression de la luciférase dans différentes lignées cellulaires de mammifères transfectées soit par du BGTC, du phosphate de calcium ou du Transfectam®.

Espèces	Lignées cellulaire	Tissus	RLU/mg de protéines cellulaires		
			BGTC	Phosphate de Calcium	Transfectam®
Humain	A549	Carcinome du poumon	$4 \times 10^5$	$7 \times 10^3$	$3,1 \times 10^5$
Singe	COS-7	Rein transformé par SV40	$2,1 \times 10^7$	$3,7 \times 10^5$	$8,4 \times 10^6$

Chien	MDCK-1	Rein	$3 \times 10^6$	$4,5 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$
Rat	RIN-m5F	Cellule tumorale d'ilot pancréatique	$2 \times 10^7$	$2 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$
	ROS	Osteosarcome	$4,0 \times 10^6$	$4,5 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$
	PC12	Pheochromocytome	$3 \times 10^7$	$1,7 \times 10^5$	$6 \times 10^6$
Souris	AtT-20	Tumeur pituitaire	$2 \times 10^7$	$8 \times 10^5$	$3 \times 10^7$

Toutes les transfections ont été faites au moins deux fois ( $n \geq 2$ ).

### **EXEMPLE 6**

#### **TRANSFECTIONS IN VITRO EN PRESENCE D'UN LIPIDE NEUTRE**

Le composé BGSC étant moins soluble en milieu aqueux que le BGTC la demanderesse a utilisé le premier sous forme de liposomes en présence d'un lipide neutre la DOPE (dioléoylphosphatidyléthanoline). Les formulations sont préparées dans un rapport molaire 3/2. Une deuxième préparation contenant cette fois ci du BGTC a également été préparée avec de la DOPE dans les mêmes conditions.

##### 6.1 - Détermination du rapport lipide total / ADN.

La demanderesse a tout d'abord déterminé le rapport lipide/ ADN au cours d'une expérience de transfection sur des cellules HeLa. La courbe obtenue est représentée figure 4. Les optima de transfection sont obtenus pour des rapports liposomes BGSC/ADN compris entre 1.5 et 5 avec un centre à 2.5-3. Les groupes guanidinium étant protonés à pH neutre, les meilleurs agrégats BGSC-DOPE/ADN ont une charge positive d'environ 3 (figure 4).

Les meilleurs rapports BGSC-DOPE/ADN sont donc inférieurs à ceux obtenus avec des agrégats de type BGTC/ADN (entre 6 et 8). La transfection en présence de liposomes cationiques est facilitée par la présence de DOPE et les propriétés fusogéniques de celle-ci.

6.2 - Transfection de différentes lignées cellulaires par des liposomes cationiques.

La demanderesse a procédé à des expériences de transfection dans différentes lignées cellulaires en utilisant des formulations de liposomes cationiques BGSC-DOPE et BGTC-DOPE dans des rapports molaires 3/2. Le rapport de charges guanidinium des lipides / phosphates de l'ADN est d'environ 2.5 (~3) pour ces deux systèmes de transfert de gènes. Une transfection avec la Lipofectin® sert de témoin. Les résultats sont exposés dans le tableau 2 ci-dessous.

Ces résultats montrent que les dérivés du cholestérol portant des groupes guanidiniums sous forme de liposomes cationiques sont au moins aussi efficaces pour la transfection que la Lipofectin. Ces résultats peuvent bien entendu être optimisés pour chaque lignée cellulaire.

Tableau 2 : Expression de la luciférase dans différentes lignées cellulaires eukaryotiques transfectées au moyen de liposomes BGSC/DOPE, de liposomes BGTC/DOPE et de Lipofectin®.

Lignées Cellulaires	RLU/mg de protéines cellulaires		
	liposomes BGSC	liposomes BGTC	Lipofectin®
HeLa	4,6 X 10 <sup>6</sup>	7,7 X 10 <sup>6</sup>	3,3 X 10 <sup>6</sup>
A 549	6 X 10 <sup>5</sup>	2 X 10 <sup>5</sup>	4 X 10 <sup>6</sup>
COS-7	ND	1,4 X 10 <sup>7</sup>	9,5 X 10 <sup>6</sup>
MDCK-1	1 X 10 <sup>6</sup>	7 X 10 <sup>6</sup>	1,9 X 10 <sup>6</sup>
ROS	ND	9 X 10 <sup>6</sup>	6 X 10 <sup>6</sup>
NB2 A <sup>a</sup>	1,5 X 10 <sup>7</sup>	1,4 X 10 <sup>7</sup>	ND
NIH 3T3 <sup>a</sup>	7 X 10 <sup>6</sup>	1,5 X 10 <sup>6</sup>	ND

Toutes les transfections ont été faites au moins trois fois ( $n \geq 3$ )

<sup>a</sup> : mesure moyenne en RLU de l'activité luciférase pour 100µg/500µg de lysat total ( $n \geq 4$ ).

### **EXEMPLE 7**

#### **5      ETUDE DE L'EFFET DE LA PRESENCE DE PROTEINES SERIQUES** **SUR L'EFFICACITE DU TRANSFERT DE GENES IN VITRO**

La plupart des compositions de transfection à base de lipides cationiques présentent une efficacité diminuée en présence de sérum. Cet exemple a pour objet de tester la sensibilité des composés de l'invention à l'effet sérum.

#### **10      7.1 - Formulations des lipides cationiques**

Les lipides décrits dans l'invention sont solubilisés dans de l'éthanol.

i) des solutions de « liposomes » sont obtenus en présence de DOPE comme suit : la DOPE (AVANTI) en solution dans le chloroforme est ajoutée aux solutions de lipide dans l'éthanol, dans un rapport molaire lipide cationique/DOPE de 3/2. Après  
**15      évaporation à sec les mixtures sont reprises dans l'eau et chauffées à 50°C pendant 30 minutes ;**

ii) des solutions de « micelles » sont obtenues en suivant le protocole décrit pour l'obtention de « liposomes » mais la solution de DOPE est remplacée par du chloroforme.

**20      Les solutions sont toutes ajustées à 10 mM en lipide cationique.**

#### **7.2 - Acide Nucléique**

L'acide nucléique utilisé est le plasmide pXL2774.

#### **7.3 - Mélanges cytofectants (préparation extemporanée)**

L'ADN est dilué à 20 µg/ml dans du NaCl 150 mM et les différentes formulations de lipide cationique sont diluées dans l'eau à 40, 80, 120 et 160 µM. Les solutions d'ADN et de lipide sont mélangées volume à volume ce qui donne des ratios en nmoles/µg ADN respectivement de 2, 4, 6 et 8 ; la concentration saline est de 75 mM

#### 7.4. - Transfections

Les cellules sont cultivées dans les conditions appropriées en microplaques de 24 puits (2 cm<sup>2</sup>/puits) et sont transfectées alors qu'elles sont en phase exponentielle de croissance et à 50-70 % de la confluence. Les cellules sont lavées par 2 fois 500 µl de milieu dépourvu de protéines sériques et remises en croissance soit en milieu sans sérum [transfection en absence de sérum], soit en milieu complet [transfection en présence de sérum] et 50 µl de mélange cytofectant [0,5 µg ADN/puits] sont ajoutés aux cellules [3 puits/condition lipide-DNA].

Quand les cellules sont transfectées en « absence de sérum » le milieu de croissance est supplémenté par la quantité appropriée de sérum 2 heures après la transfection.

L'efficacité de transfection est évaluée par une mesure de l'expression de la luciférase selon les recommandations données pour l'utilisation du kit Promega [Luciferase Assay System]. La toxicité des mélanges cytofectants est estimée par une mesure des concentrations protéiques dans les lysats cellulaires.

#### 7.5 - Résultats (Figure 5)

Les résultats obtenus avec quatre types cellulaires [NIH3T3 - 293 - HepG2 - HeLa] montrent que, dans les conditions testées, les formulations sous forme de « liposomes » sont plus efficaces que celles sous forme de « micelles ». Par ailleurs, contrairement à ce qui est observé avec la plupart des préparations cytofectantes contenant des lipides cationiques, aucun effet inhibiteur significatif lié à la présence de

sérum pour le BGTC sous forme de « liposomes » ou de « micelles » n'a pu être mis en évidence dans nos conditions de transfection.

### EXEMPLE 8

#### 5 EXPRESSION IN VIVO DE TRANSGÈNE DANS LES VOIES RESPIRATOIRES DE SOURIS AVEC DES LIPOSOMES BGTC/DOPE.

Pour ce faire, nous avons utilisé les liposomes cationiques BGTC/DOPE. L'obtention des agrégats ADN/liposomes et le protocole d'administration sont effectués comme décrits en matériel et méthode.

10 Les cellules X-gal sont détectées dans l'épithélium des voies respiratoires des souris traitées 48h après transfection au niveau des cellules du plasmide LacZ à l'aide des liposomes BGTC/DOPE. Les résultats sont présentés en figure 6.

La plupart des cellules transfectées sont localisées dans la trachée et seules quelques cellules X-gal sont observées dans les voies respiratoires secondaires. Ce type de distribution a déjà été reporté dans d'autres transfections cellulaires.

15 Nous avons en outre effectué une immunohistochimie pour identifier le produit du gène reporter. Majoritairement, ce sont les cellules matures qui sont transfectées au niveau de la surface de l'épithélium (figure 6A). Ces données montrent que les liposomes cationiques sont capables d'induire la transfection de gènes dans des cellules non prolifératives et totalement différenciées de l'épithélium des voies respiratoires.

20 L'expression du transgène est également détectée dans les glandes sous-mucosales (figure 6B). La détection par marquage immunologique des cellules transfectées, en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre la  $\beta$ -galactosidase d'E coli, confirme cette expression dans les glandes sous-mucosales et l'épithélium de surface (figure 6C). L'expression transgénique est également mise en évidence dans les glandes sous-

25 mucosales par coloration à l'immunoperoxydase avec un anticorps dirigé contre la protéine luciférase après transfection de p RSV-Luc avec BGTC/DOP (figure 6D).

Des contrôles négatifs sont effectués sans anticorps (figure 6E).

Ces résultats sont d'un intérêt tout particulier pour la thérapie génique dirigée contre la mucoviscidose. En effet, pour traiter cette pathologie, il est nécessaire de cibler les glandes sous-mucosales qui sont le site principal de l'expression de la CFTR dans les bronches humaines.

## 5 EXEMPLE 9

### DOSAGE QUANTITATIF DE L'EFFICACITE DE TRANSFECTION DE BGTC/DOPE IN VIVO

10 Pour ce faire, les poumons et la trachée de souris, traitées avec du liposome BGTC/DOPE et du plasmide pRSV-Luc dans les conditions décrites en exemple 8, sont prélevées 48h après la transfection et l'activité luciférase dosée selon le protocole décrit dans matériel et méthode.

Les résultats sont présentés dans le tableau 3 ci-après.

Tableau 3

VECTEURS	ACTIVITE LUCIFERASE (RLU/mg protéine)
<u>BGTC/DOPE Liposomes :</u>	
pRSV-Luc	$2.8 \times 10^5$ (moyenne : $3 \times 10^4 - 8 \times 10^5$ )
pRSV-Lac Z	0
<u>ADN nu</u>	
pRSV-Luc	0

15 L'activité luciférase est détectée de manière systématique dans les homogénats de trachée mais pas dans ceux des poumons. Cette observation est en accord avec les résultats précédents obtenus lors de l'examen de la distribution des cellules positives à l'Xgal. On note que l'expression luciférase est directement liée au plasmide d'expression puisque qu'aucune activité n'a pu être détectée dans le témoin contenant un plasmide LacZ. A titre témoin, il a été également été réalisé une transfection du



plasmide sans vecteur. On n'observe dans cet essai témoin aucune expression de luciférase.

Ces données démontrent l'efficacité des liposomes BGTC/DOPE pour la transfection génique in vivo des voies respiratoires.

5           **EXEMPLE 10**

**TRANSFERT DE GENE IN VIVO PAR INJECTION  
INTRAVEINEUSE OU INTRAPERITONEALE**

Les formulations des lipides cationiques et l'ADN sont décrits dans l'exemple 7.

10           10.1 - Effet Dose des lipides cationiques (figures 7-8)

Les souris BalbC âgées de 5 semaines sont injectées par voie intraveineuse (veine queue) ou intrapéritonéale par 200 µl de mélange transfectant en solution dans du NaCl 37,5 mM, glucose 5% et l'expression de la luciférase est recherchée à 24 heures post-transfection dans le poumon après injection intraveineuse, et dans le foie et la rate après injection intrapéritonéale. Les organes sont prélevés à froid dans du tampon de lyse [Promega E153A] additionné d'inhibiteurs de protéase [Boehringer 1697498] et homogénéisés avec un broyeur Heidolph DIAX600. L'activité luciférase est recherchée dans le surnageant 14000g des extraits tissulaires.

**Injection intraveineuse**

20           Chaque souris reçoit 50 µg d'ADN complexé par différentes concentrations de BGTC sous forme de « liposomes ». Le rapport optimum en nanomoles lipide cationique/µg ADN observé est de 9 (figure 7); aucune toxicité n'a pu être mise en évidence pour des doses allant jusqu'à 900 nanomoles de BGTC injectées.

**Injection intrapéritonéale :**

Le BGTC sous forme de « liposomes » a été injecté avec 100 µg d'ADN par souris. Aussi bien dans le foie (figure 8B) que dans la rate (figure 8A), le maximum d'expression est obtenu pour 1,5 nanomoles BGTC/µg d'ADN.

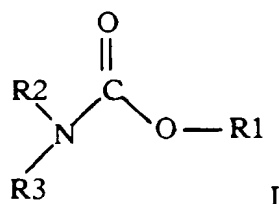
#### 10.2 - Cinétique d'expression après injection intraveineuse

5        Nous avons recherché la biodistribution de l'expression de la luciférase dans 7 organes en fonction du temps suivant l'injection de 200 µl de mélange « liposomes »BGTC/ADN dans du NaCl 37,5 mM, glucose 5% [ 50 µg ADN et 9 nanomoles BGTC/µg ADN] dans la veine de la queue de souris BalbC âgées de 5 semaines. Les résultats sont exprimés en picogramme de luciférase extraite par organe  
10        suivant une courbe de calibration avec de la luciférase commercialisée sous forme cristallisée. La limite de détection se situe entre 0,5 et 1 picogramme de luciférase.

      Nous mettons en évidence que, dans les conditions testées, le maximum d'expression est obtenu à 23 heures post-transfection pour 6 des 7 organes étudiés, à savoir le diaphragme, le gastrocnémien, le coeur, le poumon, le rein et la rate.  
15        L'expression au niveau du foie semble plus précoce. Le maximum d'expression est obtenu au niveau pulmonaire avec un taux de 0,5 nanogramme à 23 heures post-transfection.

REVENDICATIONS

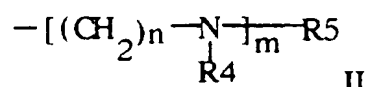
1. Composé de formule générale I et ses sels



dans laquelle:

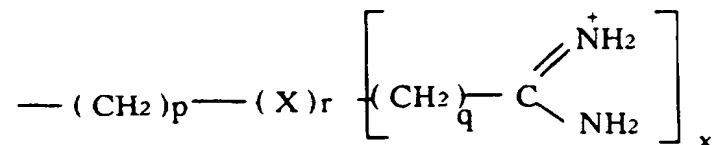
- 5 - R<sup>1</sup> représente un dérivé du cholestérol ou un groupement alkyle amino - NR'R'' avec R' et R'' représentant indépendamment l'un de l'autre un radical aliphatique, saturé ou non, linéaire ou ramifié en C<sub>12</sub> à C<sub>22</sub>,

R<sup>2</sup> et R<sup>3</sup> représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement de formule générale II avec au moins l'un d'entre eux différent d'un atome d'hydrogène,



dans laquelle:

- n et m représentent indépendamment l'un de l'autre et de manière distincte entre les groupements R<sup>2</sup> et R<sup>3</sup> un entier compris entre 0 et 4
- 15 - R<sup>4</sup> et R<sup>5</sup> représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement de formule III



## III

dans laquelle

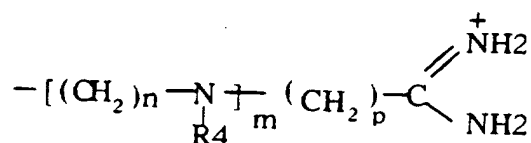
p et q représentent indépendamment l'un de l'autre un entier compris entre 0 et 4 et r est égal à 0 ou 1, avec pour r égal à 1

5 X représentant un groupement NH et x étant alors égal à 1 ou

X représentant un atome d'azote et x étant alors égal à 2.

avec p, q et r pouvant varier indépendamment entre les groupements R4 et R5.

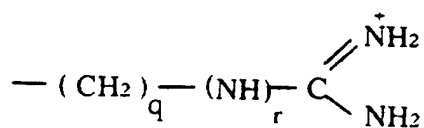
2. Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce que R2 et R3 y  
représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement  
10 de formule générale IV



IV

dans laquelle

n, m et p sont définis comme précédemment et R4 représente un atome  
d'hydrogène ou un groupement de formule V



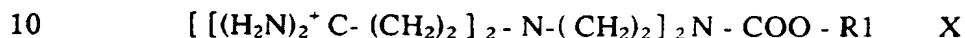
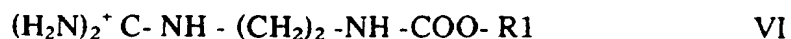
15

V

avec q et r définis comme précédemment,

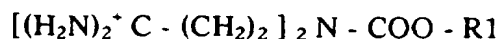
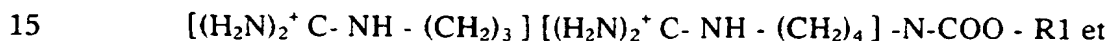
et avec m, n, p q et r pouvant varier de manière indépendante entre les différents groupements R2 et R3.

3. Composé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il s'agit  
préférentiellement d'un composé représenté par l'une des sous formules générales  
5 suivantes:



dans lesquelles R1 est défini selon la revendication 1.

4. Composé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en qu'il est  
choisi parmi



dans lesquels R1 représente un groupement cholesteryle.

5. Composé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il  
s'agit du Bis Guanidino Spermidine Cholesterol (BGSC).

- 20 6. Composé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il  
s'agit du Bis Guanidino Tren Cholesterol (BGTC).

7. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé selon l'une des revendications précédentes.
8. Composition pharmaceutique selon la revendication 7 caractérisée en ce que le composé est le Bis Guanidino Spermidine Cholesterol (BGSC).
- 5        9. Composition pharmaceutique selon la revendication 7 caractérisée en ce que le composé est le Bis Guanidino Tren Cholesterol (BGTC).
10. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 7 à 9 caractérisée en ce qu'elle contient en outre un acide nucléique.
11. Composition selon la revendication 10 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide désoxyribonucléique.
- 10        12. Composition selon la revendication 10 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide ribonucléique.
13. Composition selon l'une des revendications 10 à 12 caractérisée en ce que l'acide nucléique comporte un gène thérapeutique.
- 15        14. Composition pharmaceutique comprenant un composé selon la revendication 1, un lipide neutre et un acide nucléique.
15. Composition pharmaceutique selon la revendication 14 caractérisée en ce que le composé est choisi parmi le BGTC et le BGSC.
- 16 Composition pharmaceutique selon la revendication 14 caractérisé en ce que le lipide neutre est la DOPE.
- 20        17. Composition pharmaceutique selon la revendication 14 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide désoxyribonucléique.
18. Composition pharmaceutique selon la revendication 14 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide ribonucléique.

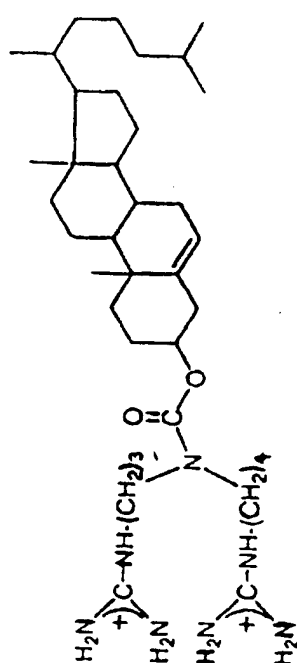
19. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 17 ou 18 caractérisée en ce que l'acide nucléique comporte un gène thérapeutique.

20. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 7 à 19 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable  
5 pour une formulation injectable.

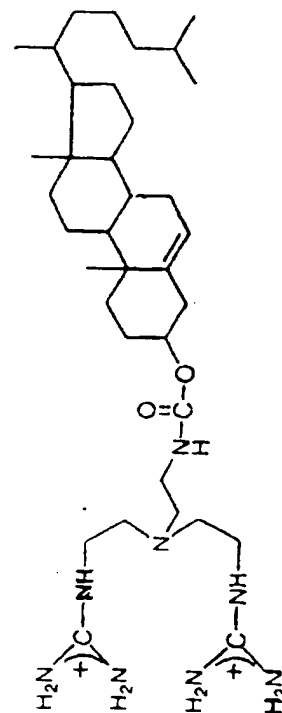
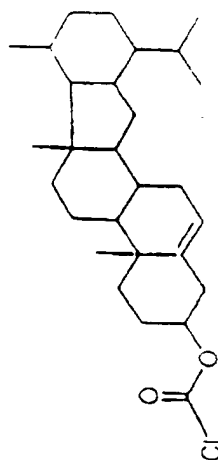
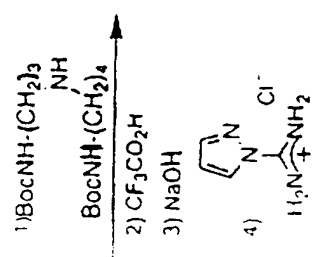
21. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 7 à 19 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une application sur la peau et/ou les muqueuses.

22. Utilisation d'un composé selon l'une des revendications de 1 à 6 pour la  
10 transfection in vitro, ex vivo et/ou in vivo de cellules.

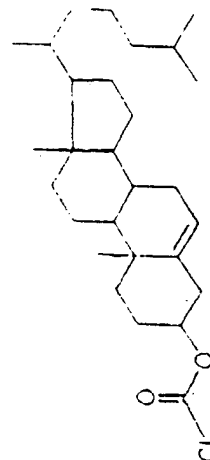
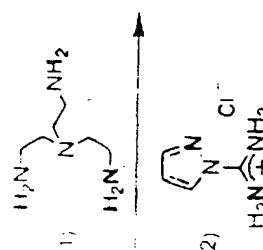
23. Méthode de transfert d'acide nucléique dans les cellules comprenant la mise en contact dudit acide nucléique avec un composé selon la revendication 1, et l'incubation du mélange résultant avec lesdites cellules.



BGSC



BGTC





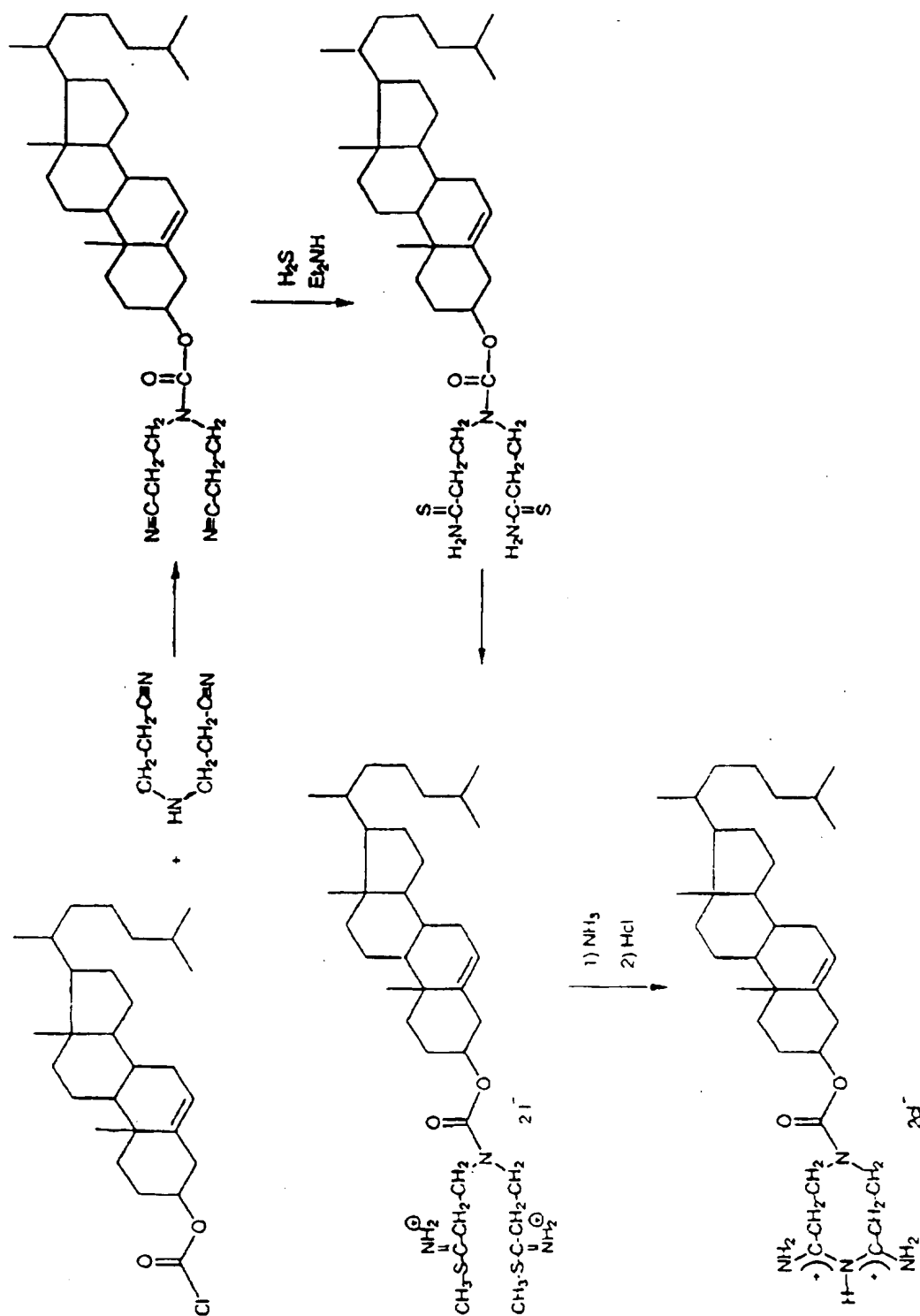


Figure 2

3/9

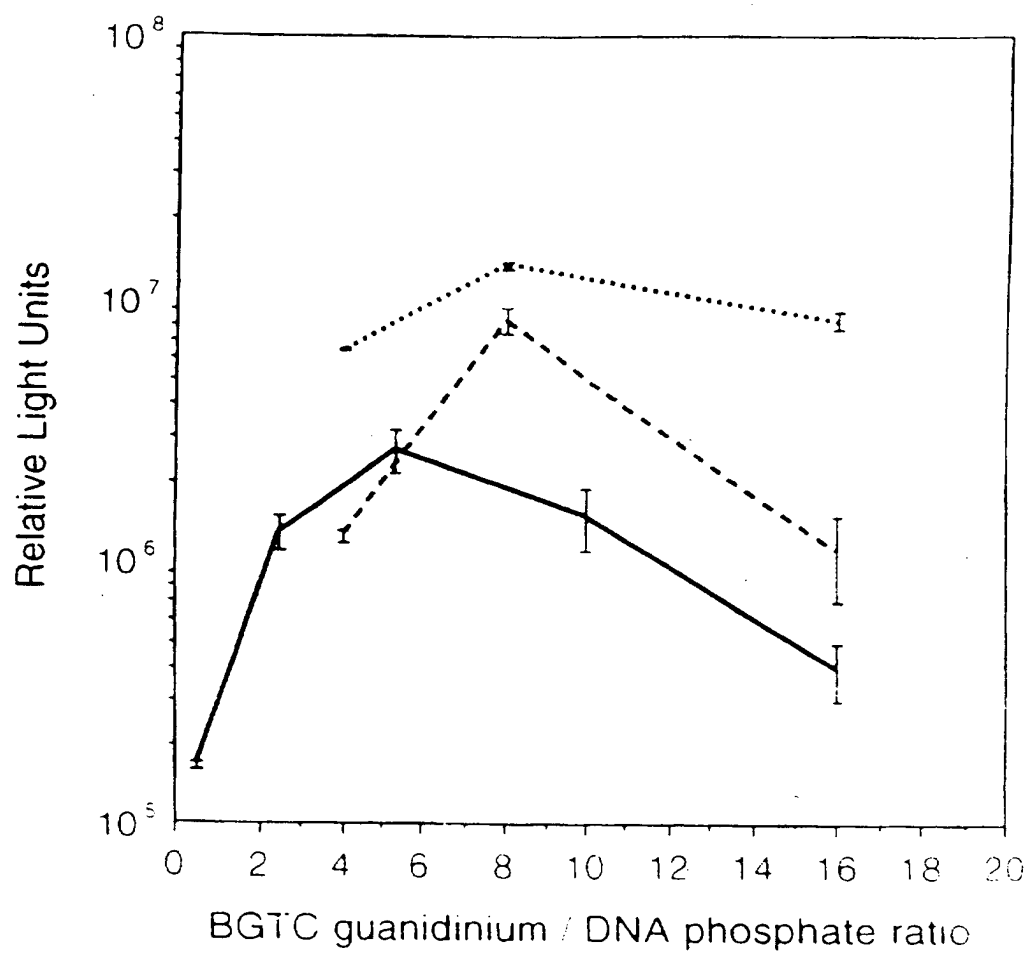


Figure 3

4/9

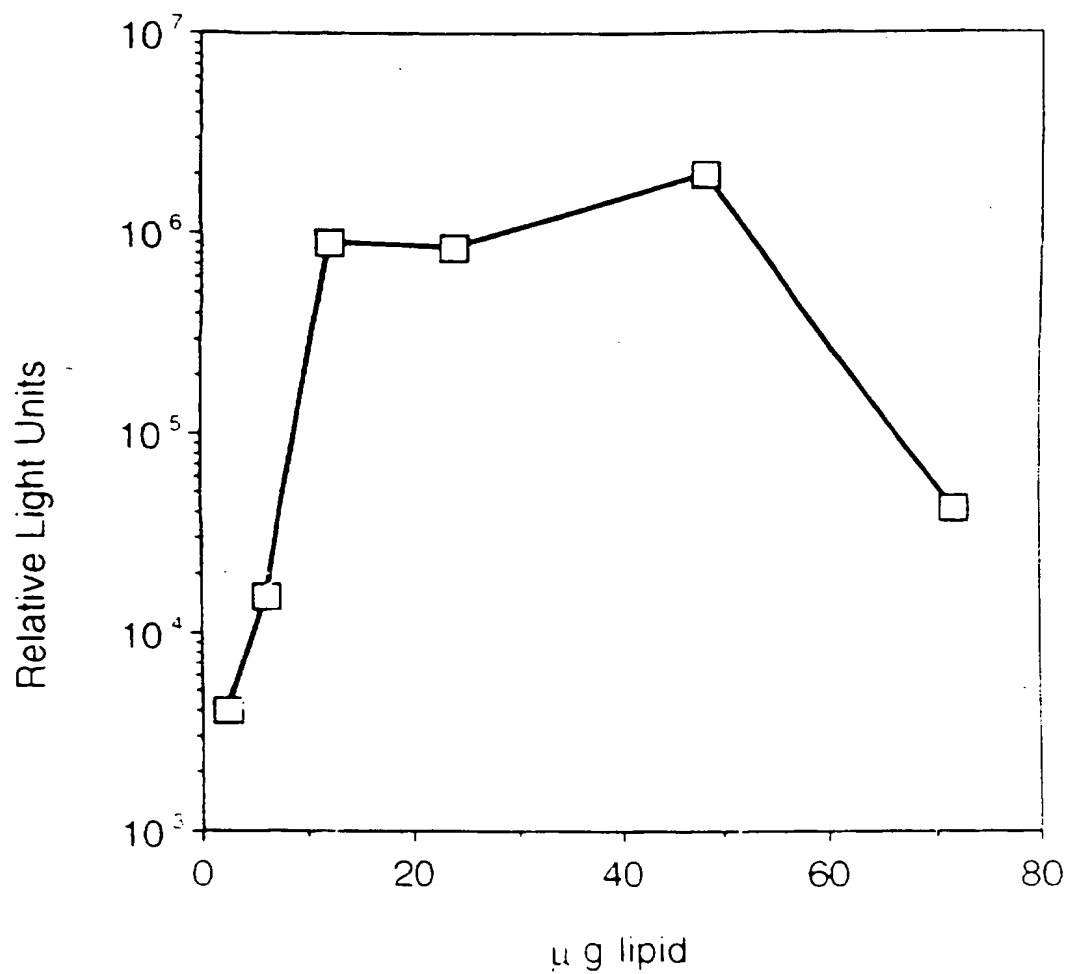


Figure 4

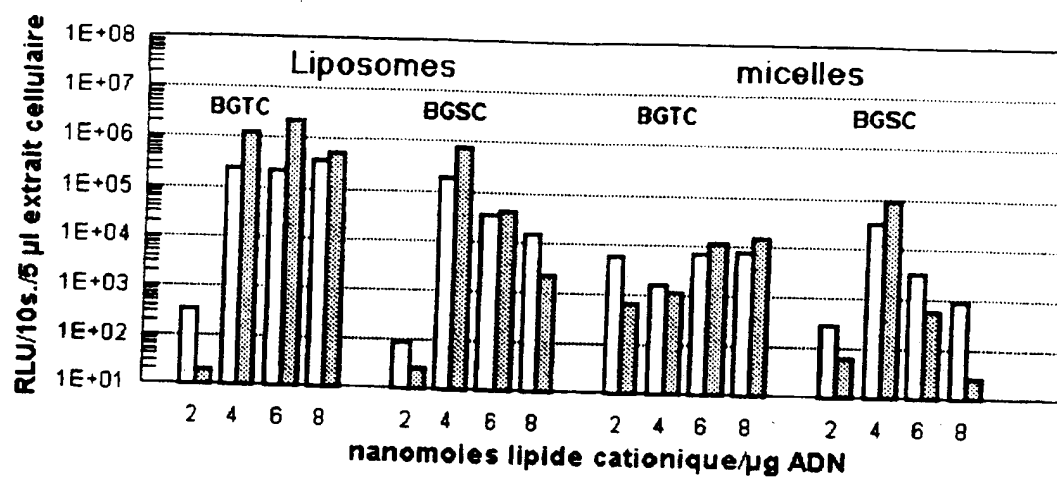


Figure 5A

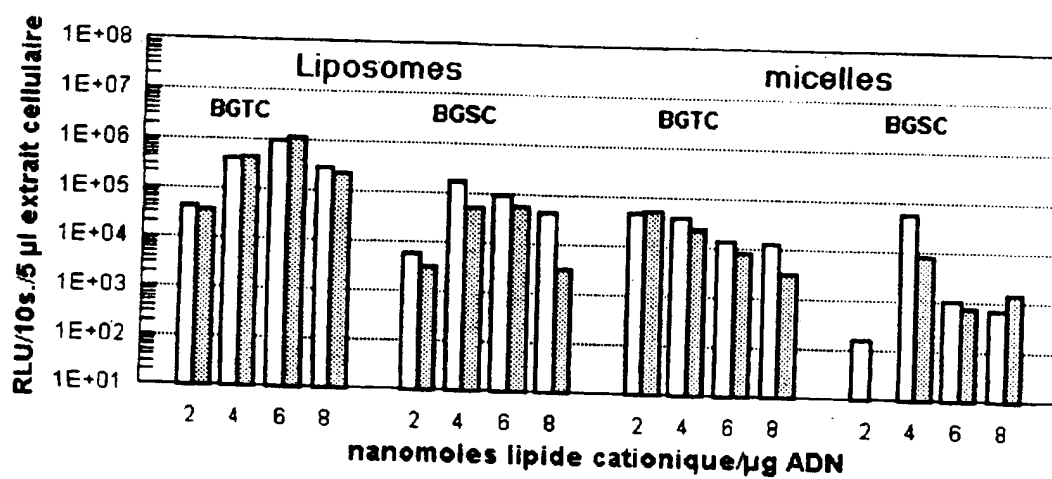


Figure 5B

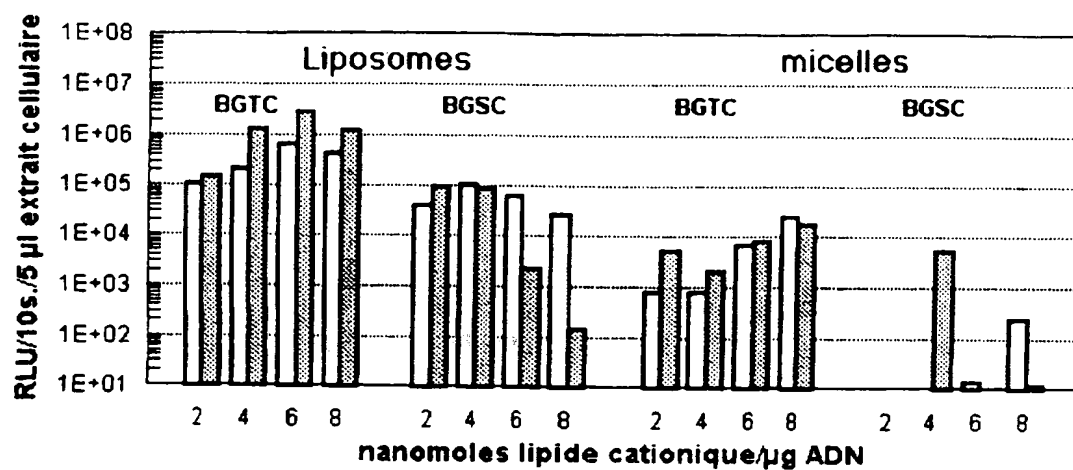


Figure 5C

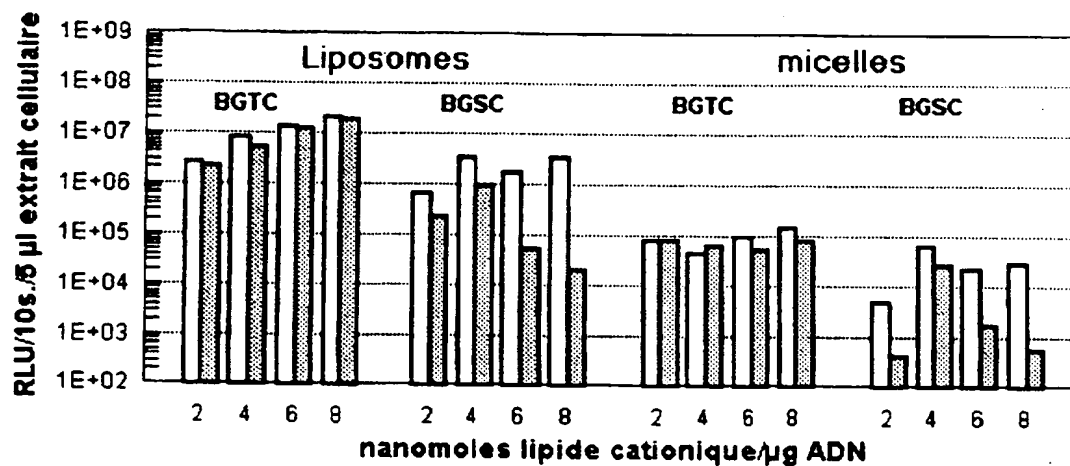


Figure 5D

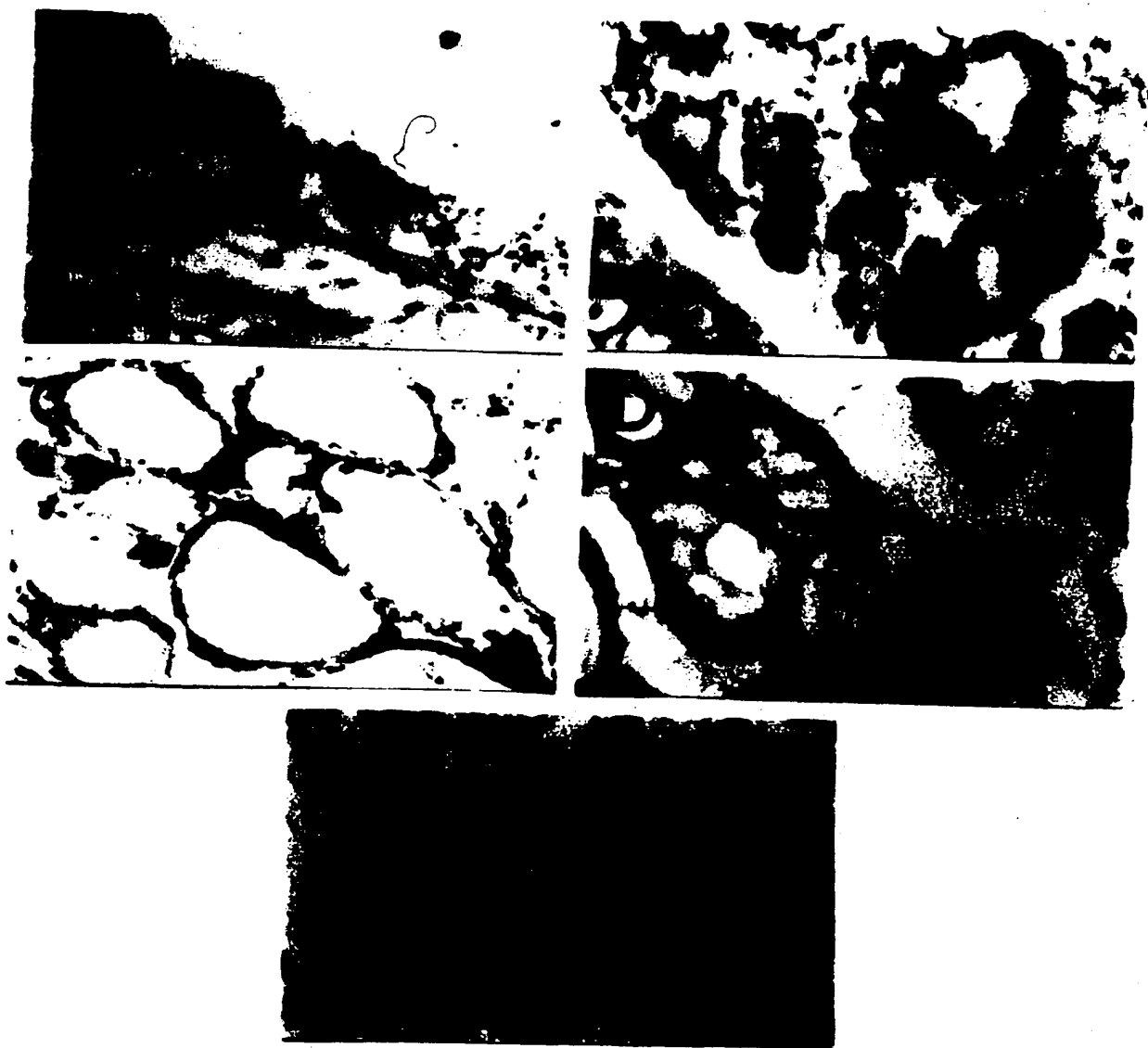


Figure 6

8/9

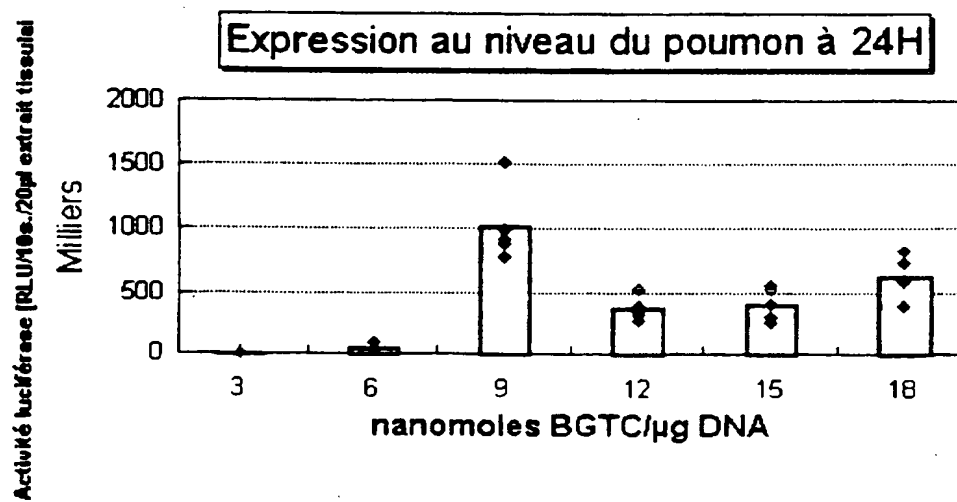


Figure 7

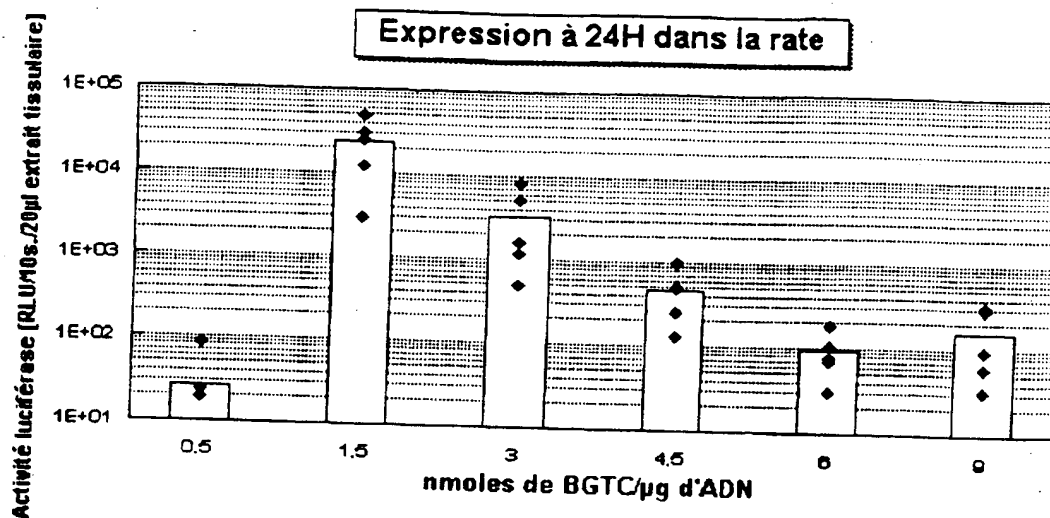


Figure 8A

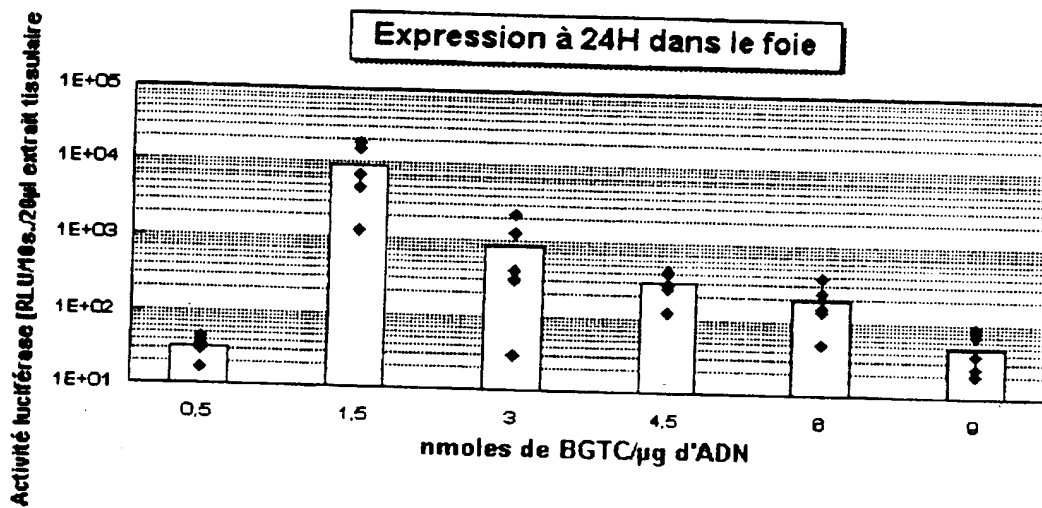


Figure 8B



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 97/00364

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07J41/00 A61K31/575 A61K9/127 C12N15/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07J A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 52, 29 December 1995, MD US, pages 31391-31396, XP002029823 J. K. GUY-CAFFEY ET AL: "Novel Polyaminolipids Enhance the Cellular Uptake of Oligonucleotides"	1,7-21
Y	see the whole document ---	1-21
X	WO 93 05162 A (UNIV TENNESSEE RES CORP) 18 March 1993	1,7-21
Y	see page 6, line 15; example XV ---	1-21
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 May 1997

Date of mailing of the international search report

20.05.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Watchorn, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

CT/FR 97/00364

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, vol. 14, no. 3-5, 1995, pages 951-955, XP002029824 K. JAYARAMAN ET AL: "Approaches to Enhance the Binding Affinity and Nuclease Stability of Triplex Forming Oligonucleotides"	1,7-21
Y	see the whole document ---	1-21
X	WO 96 01840 A (GILEAD SCIENCES INC) 25 January 1996	1,7-21
Y	see page 24; example 42 ---	1-21
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 11, 13 March 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 123040, GAGNE ET AL: "Liposome Mediated Gene Delivery. III. In Vitro Toxicity of Cationic Liposome DNA Plasmid Complexes" page 89; column 1; XP002029825 see abstract & PROC. INT. SYMP. CONTROLLED RELEASE BIOACT. MATTER, 21ST, 1994, pages 236-237, ---	1-21
P,X	WO 96 18372 A (GENZYME CORP) 20 June 1996	1,7-21
P,Y	* page 11, composé 91; Fig. 7, composés 99 et 100 *	1-21
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 93, no. 18, 3 September 1996, WASHINGTON US, pages 9682-9686, XP002030510 J. P. VIGNERON ET AL: "Guanidinium-Cholesterol Cationic Lipids: Efficient Vectors for the Transfection of Eukaryotic Cells" see the whole document -----	1-21

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**Observation: although claims 22 and 23 concern a method for treatment of (diagnostic method applied to) the human/animal body, a search was carried out and based on the claimed effects of the product (composition).**
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/00364

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9305162 A	18-03-93	US 5283185 A	01-02-94
		AU 665029 B	14-12-95
		AU 2656592 A	05-04-93
		CA 2116676 A	18-03-93
		EP 0663013 A	19-07-95
		JP 7500963 T	02-02-95
WO 9601840 A	25-01-96	WO 9601841 A	25-01-96
WO 9618372 A	20-06-96	AU 4516196 A	03-07-96

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ide Internationale No

PCT/FR 97/00364

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C07J41/00 A61K31/575 A61K9/127 C12N15/88

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07J A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 52, 29 Décembre 1995, MD US, pages 31391-31396, XP002029823 J. K. GUY-CAFFEY ET AL: "Novel Polyaminolipids Enhance the Cellular Uptake of Oligonucleotides"	1,7-21
Y	voir le document en entier ---	1-21
X	WO 93 05162 A (UNIV TENNESSEE RES CORP) 18 Mars 1993	1,7-21
Y	voir page 6, ligne 15; exemple XV ---	1-21
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 Mai 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20.05.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Watchorn, P

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

nde Internationale No

PCT/FR 97/00364

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, vol. 14, no. 3-5, 1995, pages 951-955, XP002029824 K. JAYARAMAN ET AL: "Approaches to Enhance the Binding Affinity and Nuclease Stability of Triplex Forming Oligonucleotides"	1,7-21
Y	voir le document en entier ---	1-21
X	WO 96 01840 A (GILEAD SCIENCES INC) 25 Janvier 1996	1,7-21
Y	voir page 24; exemple 42 ---	1-21
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 11, 13 Mars 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 123040, GAGNE ET AL: "Liposome Mediated Gene Delivery. III. In Vitro Toxicity of Cationic Liposome DNA Plasmid Complexes" page 89; colonne 1; XP002029825. voir abrégé & PROC. INT. SYMP. CONTROLLED RELEASE BIOACT. MATTER, 21ST, 1994, pages 236-237, ---	1-21
P,X P,Y	WO 96 18372 A (GENZYME CORP) 20 Juin 1996 * page 11, composé 91; Fig. 7, composés 99 et 100 *	1,7-21 1-21
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 93, no. 18, 3 Septembre 1996, WASHINGTON US, pages 9682-9686, XP002030510 J. P. VIGNERON ET AL: "Guanidinium-Cholesterol Cationic Lipids: Efficient Vectors for the Transfection of Eukaryotic Cells" voir le document en entier -----	1-21

**Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°  
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:  
Remarque : Bien que les revendications 22,23 concernent une méthode de traitement du (méthode de diagnostic appliqué au) corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit (à la composition).
2. ☐ Les revendications n°  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs

aux familles de brevets

de l'Internationale No

PCT/FR 97/00364

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9305162 A	18-03-93	US 5283185 A	01-02-94
		AU 665029 B	14-12-95
		AU 2656592 A	05-04-93
		CA 2116676 A	18-03-93
		EP 0663013 A	19-07-95
		JP 7500963 T	02-02-95
WO 9601840 A	25-01-96	WO 9601841 A	25-01-96
WO 9618372 A	20-06-96	AU 4516196 A	03-07-96